

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



PCT

(43) Date de la publication internationale  
17 juin 2004 (17.06.2004)

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/051257 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**G01N 30/48**

HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :  
**PCT/FR2002/004115**

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Date de dépôt international :  
29 novembre 2002 (29.11.2002)

Publiée :  
— *avec rapport de recherche internationale*

(25) Langue de dépôt : **français**

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(26) Langue de publication : **français**

(71) Déposant et  
(72) Inventeur : **AZNAR, Pascal [FR/FR]**; 5, allée Gabriel Dupont, F-78110 Le Vésinet (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

(54) Title: PRE-FILLED COLUMNS FOR FLASH CHROMATOGRAPHY AND FOR SOLID-PHASE EXTRACTION WITH HIGHER SEPARATING EFFICIENCY

(54) Titre : COLONNES PRE-REMPLIES POUR FLASHCHROMATOGRAPHIE ET POUR SOLIDE PHASE EXTRACTION AVEC POUVOIR SEPARATEUR SUPERIEUR

(57) Abstract: The invention concerns pre-filled columns for flash chromatography and for solid-phase extraction. Said columns filled with porous spherical or porous semi-spherical silica gel enables the quality of purification (in the context of flash chromatography) of products derived from chemical synthesis to be substantially enhanced. The flash chromatography technique is particularly applicable in rapid purification under low or medium pressure of synthesized chemicals in pharmaceutical, cosmetic, agrochemical or biotechnological research.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des colonnes pré-remplies pour Flashchromatographie et pour SPE. Les dites colonnes remplies de gel de silice sphérique poreuse ou semi-sphérique poreuse permettent d'augmenter très sensiblement la qualité de purification (dans le cadre de la Flashchromatographie) de produits issus de la synthèse chimique. La technique de la Flash-chromatographie s'applique tout particulièrement dans la purification rapide sous faible ou moyenne pression de produits chimiques synthétisés en recherches pharmaceutique, cosmétique, agrochimique ou biotechnologie.

**WO 2004/051257 A1**

**I. TITRE****COLONNES PRE-REMPLIES POUR FLASHCHROMATOGRAPHIE ET POUR SOLIDE PHASE EXTRACTION  
AVEC POUVOIR SEPARATEUR SUPERIEUR****II. DESCRIPTION DE L'INVENTION****II.1 Domaine technique de l'invention**

La présente invention concerne des colonnes pré-remplies pour Flashchromatographie et pour SPE. Les dites colonnes remplies en gel de silice sphérique poreuse ou semi-sphérique poreuse permettent d'augmenter très sensiblement la qualité de purification (dans le cadre de la Flashchromatographie) de produits issus de la synthèse chimique.

La technique de la Flashchromatographie s'applique tout particulièrement dans la purification rapide sous faible ou moyenne pression de produits chimiques synthétisés en recherches pharmaceutique, cosmétique, agrochimique ou biotechnologique.

20

**II.2 Etat de l'art sur la Flashchromatographie**

La chromatographie a été découverte il y a déjà plus de 100 ans par un chimiste Russe nommé TSWETT.

Ce chimiste découvrit les propriétés séparatrices de l'Alumine placée dans une colonne en verre sur laquelle il déposa de la chlorophylle. Il observa alors la migration descendante d'anneaux de couleurs le long de celle-ci.

Depuis cette découverte, de nombreuses applications analytiques, préparatives ou industrielles ont été développées.

Parmi lesquelles les plus importantes on peut citer la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie en phase liquide haute performance (ou encore en anglais, l'HPLC).

La Flashchromatographie est née du besoin de purifier rapidement et simplement des produits de synthèse chimique dans le cadre de besoin de laboratoire et pour des quantités comprises entre 10 mg et 100 g.

La Flashchromatographie se distingue de l'HPLC préparative essentiellement par la granulométrie du gel de silice (plus important pour la Flashchromatographie) et par une mise en œuvre plus simple et plus rapide de la Flashchromatographie.

Depuis plusieurs années est apparu sur le marché des colonnes de Flashchromatographie pré-remplies avec du gel de silice irrégulière poreuse de granulométrie 40-60  $\mu$  ou 20-40  $\mu$ .

40

Ces nouvelles colonnes Flashchromatographie ont apporté une convivialité accrue (mise en œuvre immédiate), cependant, aucun avantage dans la qualité de la séparation n'a été apporté.

Dans la nouvelle invention que nous décrivons, nous avons augmenté de manière très significative, les propriétés séparatives des colonnes Flashchromatographie tout en maintenant la même convivialité de la Technique ainsi qu'une faible contre-pression de travail.

### III. DESCRIPTION DE LA FABRICATION DE COLONNES PRE-REMPLIES POUR FLASHCHROMATOGRAPHIE ET POUR SPE

La fabrication d'une colonne pré-remplie pour Flashchromatographie et pour SPE s'obtient en remplissant un tube ou un corps de seringue ou tout autre corps permettant de remplir la fonction, sur lequel on fixe un fritté en bas afin que le gel de silice ne s'en aille.

On verse une quantité de gel de silice sphérique poreuse ou semi-sphérique poreuse.

Un deuxième fritté est alors placé en force en haut du lit obtenu.

60 Afin d'obtenir une bonne homogénéité dans le remplissage et d'éliminer les chemins préférentiels néfastes à la technique, on fait vibrer la colonne tout en poussant le fritté supérieur grâce à un objet approprié afin d'obtenir une compression régulière sur toute la surface du fritté.

On peut également obtenir un remplissage régulier à l'aide de liquides ou encore par voie gazeuse.

Après résorption du volume mort, nous obtenons la colonne Flashchromatographie prête à l'emploi.

On peut améliorer la qualité de tassement en faisant passer un solvant dans la colonne jusqu'à ce que le lit supérieur de la colonne se stabilise.

#### Exemple 1 – Fabrication d'une colonne pour Flashchromatographie et pour SPE – 50 g de gel de silice sphérique poreuse de 25-40 µ de granulométrie

- Longueur de la colonne : 85 mm
- Gel de silice . 50 g de gel de silice sphérique poreuse de 70 Å°
- Contenant : corps de seringue de 150 ml de volume à vide et Ø 37 mm

Prendre un corps de seringue de 150 ml et mettre un fritté poreux au fond de celui-ci.

Introduire 50 g de gel de silice sphérique poreuse dans la colonne.

Ajouter un deuxième fritté poreux sur le dessus du lit de silice.

Comprimer le fritté supérieur en vibrant l'ensemble avec un vibreur ou une table vibrante.

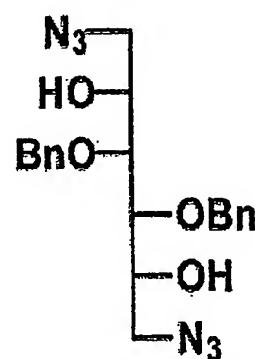
80 Attendre que le lit se stabilise et ne descende plus.

#### a) Résultats obtenus

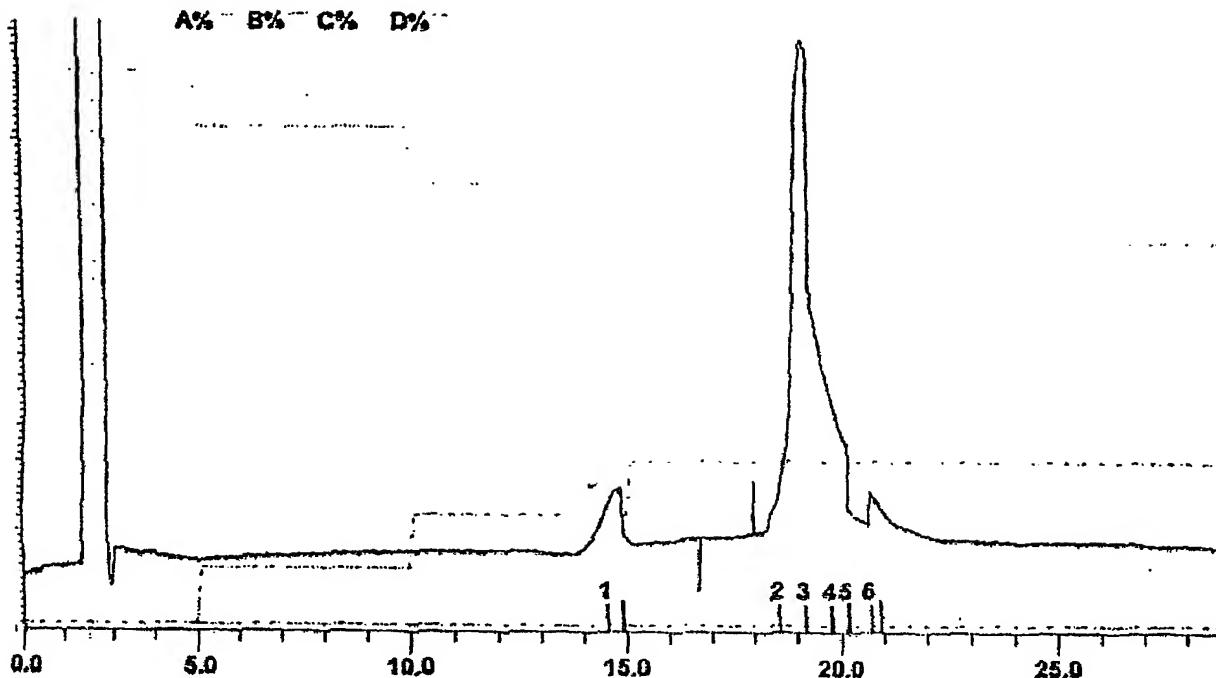
##### Condition opératoire :

- Eluant : Acétate d'éthyle/Hexane
- Débit : 35 ml/min
- Détection : UV 254 nm
- Gradient : A : Hexane / B : Acétate d'éthyle

Produit principal injecté



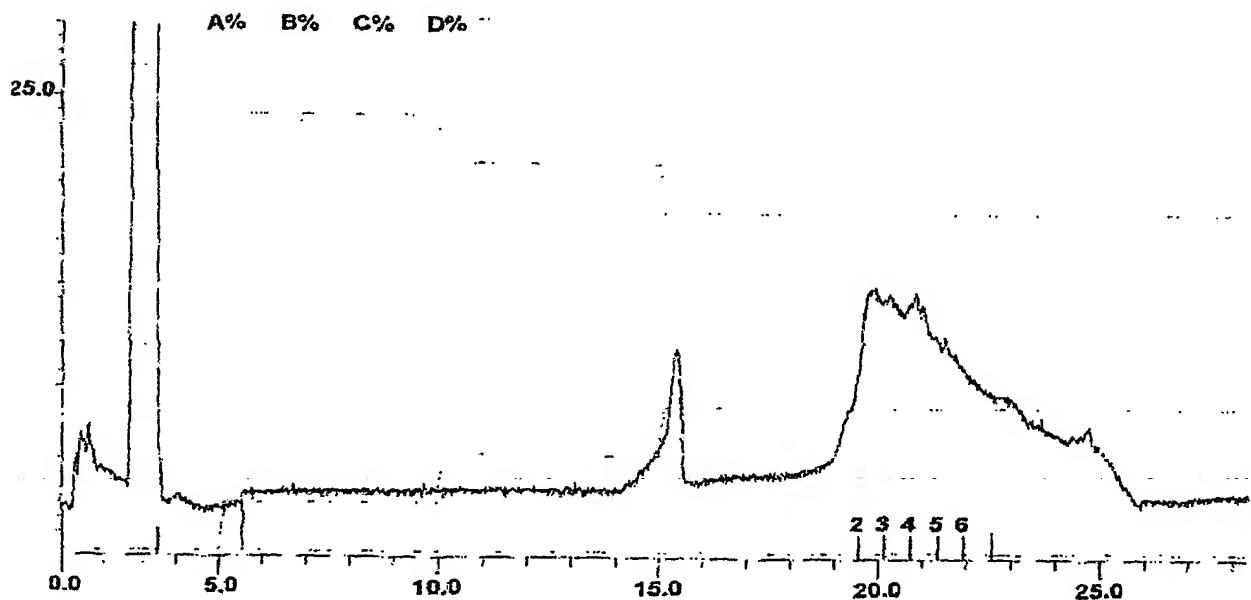
Temps	% A	% B
0	100	0
5	100	0
5.1	90	10
10	90	10
10.1	80	20
15.0	80	20
15.1	70	30
25	70	30



- Nombre de plateaux sur le pic principal : 684
- $K'$  : 10
- Pression de travail : 16 psi
- Assymétrie du pic principal : 1,75

100

b) Chromatogramme de comparaison d'une même colonne et dans les mêmes conditions mais remplie en gel de silice irrégulière de technologie antérieure à l'invention en 15-35 µm de granulométrie



- Nombre de plateaux sur le pic principal : 156
- $K'$  : 10,5
- Pression de travail : 43 psi
- Assymétrie du pic principal : 5,88

c) Tableau comparatif

	Colonne en gel de silice sphérique poreuse	Colonne en gel de silice irrégulière poreuse
<b>Nombre de plateaux</b>	684	156
<b><math>K'</math></b>	10	10,5
<b>Pression de travail</b>	16 psi	43 psi
<b>Assymétrie du pic principal</b>	1,75	5,88

**SOMMAIRE DE L'INVENTION**

120

Nouvelles colonnes pré-remplies pour Flashchromatographie et pour SPE en gel de silice sphérique poreuse ou semi-sphérique poreuse avec pouvoir séparateur supérieur.

140

## REVENDICATIONS

- 1) Les colonnes pour Flashchromatographie et pour SPE en gel de silice sphérique poreuse de granulométrie pouvant variée de 3  $\mu$  à 45  $\mu$  et de porosité pouvant variée de 30 A° à 300 A°.
- 2) Les colonnes pour Flashchromatographie et pour SPE en gel de silice semi-sphérique poreuse de granulométrie pouvant variée de 3  $\mu$  à 45  $\mu$  et de porosité pouvant variée de 30 A° à 300 A°.
- 3) Les colonnes pour Flashchromatographie et pour SPE selon les revendications 1 et 2 contenant de 10 mg à 1 Kg de gel de silice sphérique poreuse ou semi-sphérique poreuse ;
- 160 4) Les colonnes pour Flashchromatographie et pour SPE selon les revendications 1, 2 et 3 fabriquées dans des tubes de formes et de manières variées ainsi que dans des corps de seringues ou de formes semblables.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/04115

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N30/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD: "Silica Gel for flash chromatography"          TECHNICAL BULLETIN, 'Online!          6 September 2000 (2000-09-06), pages 1-3,          XP002198180</p> <p>Retrieved from the Internet:          &lt;URL: http://www.fuji-silysia.co.jp/e-f160.htm&gt; 'retrieved on 2002-05-06!          the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-4

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

21 July 2003

Date of mailing of the International search report

31/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 02/04115

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHENG C ET AL: "Analysis of the enzymatic racemization of d-aspartic acid to L-aspartic acid by the on-line coupling of a solid-phase extraction column and a ligand-exchange high-performance liquid chromatography column" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 896, no. 1-2, 27 October 2000 (2000-10-27), pages 299-310, XP004218793 ISSN: 0021-9673 page 301, left-hand column, line 7-10 ---	1-4
X	WO 92 04976 A (DU PONT) 2 April 1992 (1992-04-02) page 1, line 15,16 page 2, line 24,25 ---	1-4
A	STILL W C ET AL: "RAPID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUE FOR PREPARATIVE SEPARATIONS WITH MODERATE RESOLUTION" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, US, vol. 43, no. 14, 1978, pages 2923-2925, XP000882390 ISSN: 0022-3263 the whole document ---	1-4
E	EP 1 316 798 A (AZNAR PASCAL) 4 June 2003 (2003-06-04) the whole document -----	1-4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Int'l. Application No

PCT/FR 02/04115

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9204976	A 02-04-1992	US	5128114 A	07-07-1992
		AU	8760391 A	15-04-1992
		WO	9204976 A1	02-04-1992
		US	5352645 A	04-10-1994
EP 1316798	A 04-06-2003	EP	1316798 A1	04-06-2003

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De... internationale No

PCT/FR 02/04115

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 G01N30/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD: "Silica Gel for flash chromatography"          TECHNICAL BULLETIN, 'en ligne!          6 septembre 2000 (2000-09-06), pages 1-3,          XP002198180</p> <p>Extrait de l'Internet:          &lt;URL:<a href="http://www.fuji-silysia.co.jp/e-f160.htm">http://www.fuji-silysia.co.jp/e-f160.htm</a>&gt; 'extrait le 2002-05-06!          le document en entier</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-4

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 juillet 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/07/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Müller, T

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 02/04115

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHENG C ET AL: "Analysis of the enzymatic racemization of d-aspartic acid to l-aspartic acid by the on-line coupling of a solid-phase extraction column and a ligand-exchange high-performance liquid chromatography column" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 896, no. 1-2, 27 octobre 2000 (2000-10-27), pages 299-310, XP004218793 ISSN: 0021-9673 page 301, colonne de gauche, ligne 7-10 ---	1-4
X	WO 92 04976 A (DU PONT) 2 avril 1992 (1992-04-02) page 1, ligne 15,16 page 2, ligne 24,25 ---	1-4
A	STILL W C ET AL: "RAPID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUE FOR PREPARATIVE SEPARATIONS WITH MODERATE RESOLUTION" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, US, vol. 43, no. 14, 1978, pages 2923-2925, XP000882390 ISSN: 0022-3263 le document en entier ---	1-4
E	EP 1 316 798 A (AZNAR PASCAL) 4 juin 2003 (2003-06-04) le document en entier ---	1-4

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/04115

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9204976	A 02-04-1992	US	5128114 A	07-07-1992
		AU	8760391 A	15-04-1992
		WO	9204976 A1	02-04-1992
		US	5352645 A	04-10-1994
EP 1316798	A 04-06-2003	EP	1316798 A1	04-06-2003